



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월27일
(11) 등록번호 10-1334159
(24) 등록일자 2013년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0049461
(22) 출원일자 2013년05월02일
심사청구일자 2013년05월02일
(56) 선행기술조사문헌
Evolving Trends in Complex Culture Systems
and their Utility in Drug Development,
(2012.06.13)*
KR1020060092861 A
KR1020070045074 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김상겸
대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 503-1704
최종민
전라남도 함평군 손불면 석창리 358
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

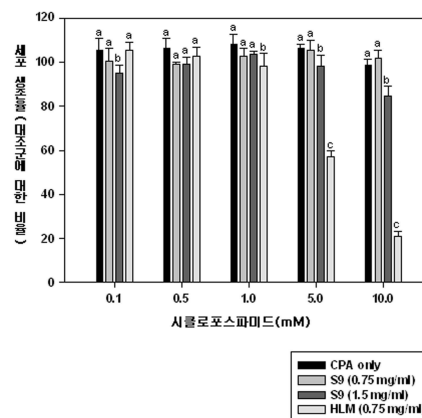
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 인간 간 마이크로솜을 이용한 약물 대사체의 간독성 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 인간 간 마이크로솜을 이용한 약물 대사체의 간독성 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 인간 간암 세포주인 HepG2 세포에 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM) 및 S9 분획을 처리하여 간 독성을 비교한 결과 HLM을 처리한 군에서 더욱 민감한 독성이 관찰되었고, 상기 HLM을 처리하였을 때 대사활성화 시스템의 최적 조건을 확립하였다. 또한, 약물 대사체에 의한 독성평가 결과, 시클로포스파미드(cyclophosphamide; CPA), 아세트아미노펜(acetaminophen) 및 디클로페낙(diclofenac)에서는 독성 증가 및 레프루노마이드(leflunomide), 바쿠치올(bakuchiol) 및 네파조돈(nefazodone)에서는 독성이 감소하고, 광범위 시토크롬 P450(cytochrome P450, CYP) 억제제인 1-아미노벤조트리아졸(1-aminobenzotriazole)을 처리하거나 또는 NADPH-생성 시스템을 제거함으로써 CPA 및 아세트아미노펜의 독성증가, 및 레프루노마이드의 독성감소가 CYP 매개이고, 디클로페낙, 바쿠치올 및 네파조돈은 다른 요인에 의해 독성이 변화됨을 확인하였다. 또한, 선택적인 CYP 억제제를 처리하였을 경우, CPA 및 레프루노마이드에 의한 독성에 있어서 각 CYP 아이소형의 기여도를 확인하였고, 열-불활성화된 HLM을 이용한 연구결과, 네파조돈 및 바쿠치올의 독성 약화가 비특이적인 단백질 결합에 의한 것이며, 본 발명의 간독성 스크리닝 방법을 통해 생성되는 독성 대사체를 분석함으로써 본 발명의 간독성 스크리닝 방법이 모약물뿐만 아니라, 이의 대사체에 대한 간독성 확인에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A100096
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	신약개발 멀티스크리닝 센터
기 여 율	1/1
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2015.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 시험관 내에서(in vitro) 간암세포인 HepG2 세포 1.5×10^1 내지 1.5×10^7 개를 배양 한 후, 피검물질 및 NADPH-생성 시스템이 포함된 분리된 인간 간 마이크로솜(human liver microsome; HLM)을 0.75 내지 1.0 mg/ml 로 6 내지 12시간 동안 처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 간암세포의 배지를 교환하여 12 내지 72시간 배양하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 간암세포에서 세포독성을 확인하는 단계를 포함하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 활성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 NADPH-생성 시스템은 NADP⁺, 글루코스-6-인산(glucose-6-phosphate), 글루코스-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase), MgCl₂, KCl로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 HLM은 0.75 mg/ml로 처리하는 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검물질 및 분리된 HLM은 처리 후 12시간 반응시키는 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 배지는 무혈청 배지인 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의

간독성 스크리닝 방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 배양은 12 내지 72시간인 것을 특징으로 하는 시험관 내에서 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법.

청구항 11

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 간 마이크로솜을 이용한 약물 대사체의 간독성 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 신약개발에 있어서 독성으로 인한 실패율은 비임상단계에서 약 20%, 그리고 임상단계에서 약 13%로 높은 비율을 차지하고 있다. 새로운 합성 화합물(new chemical entity; NCE)로 등록된 후, 퇴출된 신약 후보물질의 독성기전 및 표적장기는 불분명하나 브리스틀-마이어스 스쿼브(Bristol-Myers Squibb)의 1993 ~ 2006 년 자료에서 비임상단계의 표적 장기는 심장과 간을 합하여 약 42%인 것으로 보고되었다. 1990 년 이후 독성문제로 시판 중에 시장에서 철수한 의약품을 임상단계에서의 원인별로 분석해본 결과 13 종(약 40%)은 간독성, 11 건(33%)은 QT 시간(QT interval) 증가에 따른 심장질환(부정맥)으로 이들 두 원인이 전체 사유의 73%를 차지하고 있는 실정이다. 또한, 2004년 이후에 매년 1개 이상의 의약품이 간독성으로 시장에서 퇴출당하고 있으며, 뿐만 아니라 현재 사용중인 의약품에서도 미국 FDA에서 블랙박스 경고(black box warning, 가장 높은 단계의 경고로 의약품의 사용에 제한을 받음)가 표시된 의약품이 전체 515개 품목에 달하며 이 중에서 대부분이 주로 간독성 및 심장독성의 문제로 경고를 받고 있다.

[0003] 현재 사용되는 의약품 중 800 종 이상이 간독성을 유발하고, 이는 미국 전체 급성 간부전(Acute liver failure)의 30% 이상을 차지하고 있으며, 황달 입원 환자의 2 내지 20%를 차지하고 있다. 약물 유래 간독성(drug-induced liver injury)은 전임상단계에서 신약 개발의 중단, 임상단계에서 임상시험의 중단, 그리고 시판 후 시장에서 철수를 유발하는 가장 큰 원인이다.

[0004] 간독성을 유발하는 의약품으로는 항생제나 항암제를 비롯하여 고혈압치료제, 항경련제, 고지혈증치료제, 항정신성의약품, 비스테로이드성 항염제, 흡입마취제, 당뇨병치료제, 생약제제 등으로 매우 다양하고, 최근 미국 FDA 및 유럽의약품(European Medicines Agency)에서도 약물 유래 간독성을 최소화하기 위해 노력하고 있다. 간독성의약품의 간독성 기전을 분석하면 대사활성화가 큰 비중을 차지하며 미국 FDA에서는 2008년 2월 "약물 대사체의 산업상 안전성 검사를 위한 안내"를 발행하여 약물 대사체에 대한 연구가 신약개발에서 중요한 연구분야임을 강조하였다.

[0005] 간독성으로 퇴출된 약물 14종 중 9종, 경고문이 부착된 약물 14종 중 10종에서 활성 대사체가 보고되어있고, 일반적으로 약물에 의한 간독성은 모약물(parent drug)보다는 모약물로부터 유래된 대사체에 기인하는 경우가 대부분이다. 간독성을 유발하는 약물 대사체의 물리화학적 특성중 간독성을 매개하는 특징은 친전자성이다. 따라서, 친전자성의 독성 대사체의 형성을 탐색할 수 있는 연구방법이 신약개발의 초기 단계에 제안되고 있다. 대사 활성화가 문제를 유발할 수 있는 화학적인 구조로는 1)히드라진(hydrazines) 및 히드라지드(hydrazide), 2)아릴아세트산(arylacetic acid) 및 아릴프로피온산(arylpropionic acid), 3)티오펜(thiophene), 퓨란(furan) 및 피롤(pyrrole), 4)아닐린(aniline) 및 아닐리드(anilide), 5)퀴논(quinone) 및 퀴논이민(quinoneimine), 6)중간사슬 지방산(medium chain fatty acid), 7)할로젠화 탄화수소(halogenated hydrocarbon) 및 일부 할로젠화 방향족(halogenated aromatic)(Br > Cl > F), 8)니트로방향족(nitroaromatic), 9) α, β -불포화 엔올-성 구조(α, β -unsaturated enol-like structure), 10)티올(thiol) 또는 티오노(thiono)[티아졸리딘디온

(thiazolidinedione) 및 티오우레아(thiourea)], 11)아미노티아졸(aminothiazole)류 등이 있으며, 매우 다양한 구조를 갖는다.

- [0006] 현재 신약개발에 있어서 간독성 평가시스템의 문제점이 다양하게 존재한다. 첫째, 간독성을 예측할 수 있는 특정 표적의 부재를 들 수 있다. 예를 들어, 심장독성의 경우 HERG 채널 분석(channel assay)이 심장독성의 평가를 기준으로 제시되어 생체 내에서 효과와 연관성에 대한 논문이 보고되고 있으나, 간독성은 특정 표적 단백질을 평가 시스템을 구축하기 어렵다는 문제점이 있다.
- [0007] 둘째, 동물 실험결과와 인간 간독성 예측력이 미약하다. 예를 들어, 국제 생명과학 연구소(international life sciences institute)의 1999년 연구결과 238 종의 신약 후보물질 중에서 31개가 신약 개발과정에서 간독성이 있는 것으로 관찰되었으나, 동물실험에서 간독성이 관찰된 것은 58%로 동물실험에서 간독성의 예측력이 상대적으로 낮다. 또한 룽프랑 로리(Rhone-Roulenc Rorer)의 간독성 평가 결과분석에서 동물 실험결과는 임상 결과의 차이가 큰 것으로 보고되었다.
- [0008] 셋째, 고감수성 개체에서 특이체질성 간독성(idiosyncratic hepatotoxicity)의 발현이 확인되었다. 시장에서 철수한 간독성 약물은 특징적으로 용량 의존성과 기전이 불분명하고, 감수성이 강한 특정 개체에서 매우 심각한 독성을 유발한다(약 만명 또는 10만명 중에서 한명). 따라서, 임상 3상까지의 임상실험과정 또는 NDA(new drug application) 과정에서 발견하지 못하는 문제가 발생할 수 있다.
- [0009] 넷째, 고전적인 동물시험에서 간독성의 예측력은 신약개발에서 산업체의 요구에 부합하지 못한다. 종에 따른 약물 대사체 패턴의 정성 및 정량적인 차이로 중간 간독성에 차이를 발생시키고, 또한 고전적인 간독성 평가의 경우 특이체질성 간장애(idiosyncratic liver injury)에 의해 시장에서 퇴출된 약물의 간독성을 예측하지 못하였다.
- [0010] 다섯째, 세포배양 실험계로 인간 간암세포주인 HepG2 세포, 형질전환 HepG2 세포[시토크롬 450P(cytochrome P450, CYP) 등 약물대사효소 과발현 세포주], 불멸화된 인간 간세포(immortalized human hepatocytes)(SV40 T 항원 유전자 삽입 등), 일차 간세포(primary hepatocytes)(인간 또는 랫 등) 등이 간독성 예측 모델로 사용되고 있으나 모두 임상에서의 간독성 예측에는 큰 한계가 있다.
- [0011] 간독성은 다른 독성에 비하여 종차가 크고, 대사체에 의해서 발생하기 때문에 모약물(parent drug)의 독성과 함께 대사체(metabolite)의 독성을 평가해야 한다. 인간 간세포는 간독성 예측의 금분위제(gold standard)이나 구입이 제한적이고 개체차가 크다는 단점이 있다. 인간 간암세포인 HepG2 세포는 다른 인간 간암세포주에 비해 간의 선택적인 단백질의 발현으로 간세포의 특성을 일부 보유하고 있으나, 대사활성의 중심인 CYP의 발현이 매우 제한적이라, 실제로 CYP의 기질을 이용한 활성평가에서 HepG2 세포는 매우 낮은 활성을 보였으며, 각각의 CYP에 선택적인 항체로 CYP의 단백질 함량을 평가하였을 때, 검출한계 이하로 측정되는 아이소형(isoform)이 대부분이다. 이런 약물 대사효소의 부재는 대사 활성화에 의한 독성을 평가하기에 HepG2 세포에 한계가 있음을 나타내고, 시험적으로 일부 세포주에 CYP 아이소형을 유전자 조작 및 삽입하여 발현을 증가시킨 실험이 진행중이다. 그러나 CYP 아이소형의 다양성을 고려할 때 신약개발의 초기 단계에 사용하기에는 한계가 있다.
- [0012] 최근 Otto 등은 에임즈 검사(ames test)에 사용하는 랫의 간 S9 분획(liver S9 fraction)을 세포 배양액에 가하고, 화학물질의 독성을 평가한 결과 HepG2 세포에서 대사체에 의해 독성이 발현되는 화학물질에 의한 세포 독성이 증가함을 확인하였다. S9 분획은 약물 대사효소의 대부분은 갖고 있어, CYP의 발현이 낮은 HepG2 세포에 약물 대사능력을 보완해줄 수 있다. 그러나 S9 분획에는 무독화효소도 포함하고 있어 배지에 유리되는 GSH를 이용한 친전자성 물질의 무독화, 알데히드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase), 알데히드 산화효소(dehydrogenase), 퀴논 환원효소(quinone reductase) 등의 효소에 의한 알데히드(aldehyde) 및 퀴논(quinone) 화학물질의 무독화가 신속하게 진행될 수 있다는 한계가 있다. 특히 랫의 간 S9 분획은 약물대사의 측면에서 종차로 인한 간독성 예측에 오류를 유발할 수 있다.
- [0013] 이에 본 발명자들은 모약물뿐만 아니라, 이의 대사체에 대한 간독성을 평가할 수 있는 방법을 연구하던 중, 인간 간암 세포주인 HepG2 세포에 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM) 및 인간 간 S9 분획을 처리하여 간독성을 비교한 결과 HLM을 처리한 군에서 더욱 민감한 독성이 관찰되었고, 상기 HLM을 처리하였을 때 대

사활성화 시스템의 최적 조건을 확립하였다. 약물 대사체에 의한 독성평가 결과, 시클로포스파미드(cyclophosphamide; CPA), 아세트아미노펜(acetaminophen) 및 디클로페낙(diclofenac)에서는 독성이 증가하였고, 반면에 레프루노마이드(leflunomide), 바쿠치올(bakuchiol) 및 네파조돈(nefazodone)의 세포독성은 감소하였다. 또한, 광범위 시토크롬 P450(cytochrome P450, CYP) 억제제인 1-아미노벤조트리아졸(1-aminobenzotriazole)을 처리하거나 또는 NADPH-생성 시스템을 제거함으로써 CPA와 아세트아미노펜의 독성증가 및 레프루노마이드의 독성감소가 CYP 매개성임을 확인하였다. 반면, 디클로페낙, 바쿠치올 및 네파조돈은 다른 요인에 의해 독성이 유발되거나 감소함을 확인하였다. 또한, 선택적인 CYP 억제제를 처리하였을 경우, CPA 및 레프루노마이드에 의한 독성에 있어서 각 CYP 아이소형의 기여도를 확인하였다. 또한, 열처리를 하여 불활성화시킨 HLM을 이용한 실험결과는 네파조돈 및 바쿠치올의 독성 약화가 비특이적인 단백질 결합에 의한 것임을 시사하여, 본 발명의 간독성 스크리닝 방법을 통해 생성되는 독성 대사체를 분석함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 대사체에 의해 발생하고, 전임상단계에서 신약 개발의 중단, 임상단계에서 임상시험의 중단, 그리고 시판 후 시장에서 철수를 유발하는 가장 큰 원인인 간독성 스크리닝에 있어서, 현재 사용되고 있는 간독성 스크리닝의 문제점을 극복할 수 있는 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM)을 이용한 약물 대사체의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법을 제공한다:

[0016] 1) 간암세포를 배양한 후, 피검물질 및 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM)을 처리하는 단계;

[0017] 2) 상기 단계 1)의 간암세포의 배지를 교환하여 배양하는 단계; 및

[0018] 3) 상기 단계 2)의 간암세포에서 세포독성을 확인하는 단계.

[0019] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법을 제공한다:

[0020] 1) HepG2 세포를 배양한 후, 피검물질 및 NADPH-생성(NADPH-generating) 시스템이 포함된 HLM을 0.5 내지 1.0 mg/ml 처리하여 6 내지 12시간 동안 반응시키는 단계;

[0021] 2) 상기 단계 1)의 세포주를 무혈청 DMEM 배지로 교체한 후, 36 내지 42시간 배양하는 단계; 및

[0022] 3) 상기 단계 1)의 세포주에서 세포독성을 확인하는 단계.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 현재 사용되는 의약품 중 800종 이상이 유발하는 간독성을 확인함에 있어서, 간독성을 예측할 수 있는 표적의 부재, 동물 실험결과와 미약한 간독성 예측력 및 특이체질성 간독성에 의해 기존에 사용되고 있는 동물시험에서의 간독성 스크리닝 방법이 갖는 한계를 극복하기 위하여, 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM)을 이용한 약물 대사체의 스크리닝 방법을 개발하여 모약물뿐만 아니라, 이의 대사체에 대한 간독성 확인에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 S9 분획(S9 fraction) 및 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM)을 이용한 독성물질의 독성 평가방법을 나타내는 도이다.

도 2는 S9 분획 또는 HLM을 사용하여 시클로포스파미드(cyclophosphamide; CPA)의 간독성을 나타내는 도이다.

도 3은 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 HLM의 반응 시간 및 처리농도에 따른 효과를 나타내는 도이다.

도 4는 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 NADPH-생성 요소에 의한 효과를 나타내는 도이다.

도 5는 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 다양한 화학물질의 독성평가 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 시토크롬 P450(cytochrome P450; CYP) 억제제 처리 및 NADPH-생성 시스템을 제거하였을 때 독성평가 결과를 나타내는 도이다:

ABT: CYP 억제제 1-아미노벤조트리아졸(1-aminobenzotriazole).

도 7은 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 선택적인 CYP 억제제에 의한 독성평가 결과를 나타내는 도이다:

PRX: CYP2B6 억제제 파록세틴(paroxetine),

KCZ: CYP3A4 억제제 케토코나졸(ketoconazole), 및

Mix: 파록세틴 및 케토코나졸의 혼합물.

도 8은 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 열불활성화된 HLM을 이용하였을 때, 바쿠치올(bakuchiol) 및 네파조돈(nefazodone)의 독성평가 결과를 나타내는 도이다.

도 9는 HLM을 사용한 대사 활성화 시스템에서 열불활성화된 HLM의 농도에 따른 바쿠치올(bakuchiol) 및 네파조돈(nefazodone)의 독성평가 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0026]

본 발명은 하기 단계를 포함하는 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법을 제공한다:

[0027]

1) 간암세포를 배양한 후, 피검물질 및 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes; HLM)을 처리하는 단계;

[0028]

2) 상기 단계 1)의 간암세포의 배지를 교환하여 배양하는 단계; 및

[0029]

3) 상기 단계 2)의 간암세포에서 세포독성을 확인하는 단계.

[0030]

상기 단계 1)에 있어서 간암세포를 인간 간암세포로부터 유래한 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 HepG2 세포주인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 당업계의 당업자에게 잘 알려진 간암 세포주라면 모두 사용가능하다. 또한, 상기 간암세포를 배양하기 위하여 1.5×10^1 내지 1.5×10^7 개의 세포를 사용하는 것이 바람직하고, 1.5×10^4 내지 1.5×10^5 개의 세포를 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 1.5×10^4 개의 세포를 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0031]

또한, 상기 단계 1)의 피검물질은 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 활성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물조직 추출액 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0032]

또한, 상기 단계 1)의 HLM은 NADPH-생성 시스템(NADPH-generating system)을 포함하는 것이 바람직하고, 상기 NADPH-생성 시스템은 NADP⁺, 글루코스-6-인산(glucose-6-phosphate), 글루코스-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase), MgCl₂ 및 KCl을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 HLM은 0.1 내지 10 mg/ml로 처리하는 것이 바람직하고, 0.5 내지 5 mg/ml로 처리하는 것이 더욱 바람직하며, 0.75 mg/ml로 처리하는 것이 가장 바람직하고, 상기 HLM의 처리 후 반응 시간에 있어서는 2 내지 24시간 반응시키는 것이 바람직하고, 6 내지 18시간 반응시키는 것이 더욱 바람직하며, 12시간 반응시키는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0033]

또한, 상기 단계 2)의 배지는 무혈청 배지(serum-free media)인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 아울러 배지를 교환한 후 12 내지 72시간 동안 배양하는 것이 바람직하고, 24 내지 54시간 동안 배양하는 것이 더욱 바람직하나, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 36시간 동안 배양하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지

않는다.

[0034] 또한, 상기 단계 3)의 세포독성을 확인하는 방법은 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 분석을 사용하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 당업계의 당업자에게 잘 알려진 방법이라면 모두 사용가능하다.

[0035] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 피검물질 대사체의 간독성 스크리닝 방법을 제공한다:

[0036] 1) HepG2 세포를 배양한 후, 피검물질 및 NADPH-생성(NADPH-generating) 시스템이 포함된 HLM을 0.5 내지 1.0 mg/ml 처리하여 6 내지 12시간 동안 반응시키는 단계;

[0037] 2) 상기 단계 1)의 세포주를 무혈청 배지로 교체한 후, 36 내지 42시간 배양하는 단계; 및

[0038] 3) 상기 단계 1)의 세포주에서 세포독성을 확인하는 단계.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0040] <실시예 1> 인간 간 마이크로솜(human liver microsome; HLM)을 이용한 대사활성화 시스템의 비교

[0041] 본 발명의 HLM(BD Gentest, 미국)을 이용한 독성물질의 세포 독성 평가를 비교하기 위하여 세포독성 실험을 수행하였다.

[0042] 구체적으로, 인간 간암 세포인 HepG2 세포주(한국세포주은행, 대한민국)를 96웰 플레이트(plate)에 웰당 1.5×10^4 개를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 배양 배지를 제거하였다. 그리고나서, 시클로포스파미드(cyclophosphamide; CPA)를 녹인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교환한 뒤, 바로 NADPH-생성 시스템(NADPH-generating system)[NADP⁺, 글루코스-6-인산(glucose-6-phosphate), 글루코스-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase), MgCl₂, KCl]이 포함된 S9 분획 및 HLM을 처리하였다. 처리 6시간 후, 새로운 무혈청(serum-free) DMEM 배지로 교환하고, 추가로 42시간 배양한 뒤 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 분석을 통해 세포 독성을 확인하였다.

[0043] <비교예 1> S9 분획(S9 fraction)을 이용한 대사활성화 시스템의 비교

[0044] 기존에 공지된 S9 분획[M. Otto et al., Cell Biol Toxicol (2008) 24:87-99]을 이용한 독성물질의 세포 독성 평가를 비교하기 위하여 세포독성 실험을 수행하였다.

[0045] 구체적으로, 인간 간암 세포인 HepG2 세포주를 96웰 플레이트(plate)에 웰당 1.5×10^4 개를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 배양 배지를 제거하였다. 그리고나서, 시클로포스파미드(cyclophosphamide; CPA)를 녹인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 교환한 뒤, 바로 NADPH-생성 시스템(NADPH-generating system)[NADP⁺, 글루코스-6-인산(glucose-6-phosphate), 글루코스-6-인산 탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase), MgCl₂, KCl]이 포함된 S9를 처리하였다. 처리 6시간 후, 새로운 무혈청(serum-free) DMEM 배지로 교환하고, 추가로 42시간 배양한 뒤 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] 분석을 통해 세포 독성을 확인하였다.

[0046] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 NADPH-생성 시스템과 함께 S9 또는 HLM을 각각 HepG2 세포주에 처리하였을 때, S9 보다 HLM을 처리한 조건에서 더 민감한 독성이 관찰되었다(도 2). 이는 HLM을 이용한 방법이 대사 독성 평가에 더 유용함을 나타낸다.

[0047] <실시예 2> HLM을 이용한 대사활성화 시스템의 조건확립

[0048] <2-1> HLM 반응시간 및 처리농도에 따른 효과 확인

[0049] HLM을 이용한 대사활성화 시스템에서 HLM 반응시간 및 처리농도에 따른 효과를 확인하기 위하여 세포 독성평가를 상기 <실시예 1>의 방법으로 수행하였다.

[0050] 구체적으로, 반응시간에 따른 독성 평가효과를 확인하기 위하여 HLM 0.75 mg/ml을 처리하고, 6시간 또는 12시간 반응 후, 새로운 무혈청 DMEM 배지로 교환하고, 추가로 36시간 또는 42시간 배양한 뒤 MTT 분석을 수행하였다. 아울러, HLM 처리농도에 따른 독성 평가효과를 확인하기 위하여 HLM을 0.125, 0.25, 0.5 또는 0.75 mg/ml로 12시간 처리한 후, 새로운 항혈청 DMEM 배지로 교환하고 추가로 36시간 배양한 뒤, MTT 분석을 수행하였다.

[0051] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 DMEM 배지 조건에서 HLM의 반응시간 및 처리농도에 의존적으로 CPA의 독성에 민감하게 반응하는 것을 확인하였다(도 3).

[0052] <2-2> NADPH-생성 요소(component)에 따른 효과 확인

[0053] HLM을 이용한 대사활성화 시스템에서 NADPH-생성 요소에 따른 효과를 확인하기 위하여 세포 독성평가를 상기 <실시예 1>의 방법으로 수행하였다.

[0054] 구체적으로, HLM 0.75 mg/ml이 포함되었으며, NADP^+ , 글루코스-6-인산 또는 글루코스-6-인산 탈수소효소가 각각 제거된 NADPH-생성 시스템을 처리하고 12시간 후, 새로운 무혈청 DMEM 배지로 교환하고, 추가적으로 36시간 배양한 뒤 MTT 분석을 수행하였다.

[0055] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 NADP^+ 를 제거하였을 때 CPA에 의한 세포 독성이 완전히 억제된 것을 확인하였다. 반면, 글루코스-6-인산 또는 글루코스-6-인산 탈수소효소를 제거하였을 때는 CPA에 의한 세포 독성이 현저히 약화하므로, CPA에 의한 세포독성이 NADPH 의존적임을 확인하였다(도 4).

[0056] 따라서, HepG2 세포주에서 HLM을 이용한 대사활성화 시스템의 최적 조건은, 상기 세포주에 독성물질을 녹인 DMEM 배지에서 HLM 0.75 mg/ml을 12시간 처리하고, 배지를 제거한 후, 36시간 추가배양하는 것임을 확립하였다.

[0057] <실험예 1> HLM을 이용한 대사활성화 시스템에서 약물 대사체의 독성 평가

[0058] <1-1> 약물 대사체에 의한 독성평가 확인

[0059] 본 발명의 대사활성화 시스템을 이용하여 아세트아미노펜(acetaminophen), 디클로페낙(diclofenac), 레프루노마이드(leflunomide), 바쿠치올(bakuchiol) 및 네파조돈(nefazodone)의 대사체 독성평가를 상기 <실시예 2>에서 수립된 최적의 조건으로 수행하였다.

[0060] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 아세트아미노펜 및 디클로페낙의 세포 독성이 현저히 나타났고, 레프루노마이드, 바쿠치올 및 네파조돈은 본 발명의 대사활성화 시스템에서 독성이 약화하는 것을 확인하였다(도 5).

[0061] <1-2> CYP 억제제(inhibitor)가 처리된 HLM을 이용한 독성평가

[0062] 상기 실험예 <1-1>의 결과가 CYP 매개 및 특정 아이소형(isoform)의 반응인가 확인하기 위하여 본 발명의 대사활성화 시스템에 CYP 억제제를 처리한 후, 약물 대사체에 의한 독성평가를 수행하였다.

[0063] 구체적으로, 독성평가는 상기 <실시예 2>에서 수립된 조건으로 수행되었고, HLM에 광범위한 CYP 억제제인 1-아미노벤조트리아졸(1-aminobenzotriazole; ABT)을 첨가 후, 상온에서 20분 이상 반응시키고 세포에 처리하였다.

[0064] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 CPA 및 아세트아미노펜은 CYP 매개 독성을 나타내었고, 디클로페낙에 대한 독성은 CYP 매개 되지 않음을 확인하였다. 또한, 레프루노마이드의 약화된 독성은 CYP 매개이고, 바쿠치올의 약화된 독성은 CYP 매개가 아님을 확인하였다(도 6).

[0065] <1-3> CYP 아이소형에 따른 독성평가

[0066] CYP에 의해 대사체의 독성을 나타내는 시클로포스파미드(cyclophosphamide; CPA) 및 독성이 약해지는 레프루노마이드에 대한 특정 CYP 아이소형에 따른 독성을 평가하기 위하여, 다양한 아이소형의 선택적인 CYP 억제제로 CYP1A2를 억제하는 푸라피린(furafyline) 6 μ M, CYP2B6를 억제하는 파록세틴(paroxetine) 10 μ M 또는 CYP3A4를 억제하는 케토코나졸(ketoconazole) 1 μ M을 처리하여 상기 실험에 <1-2>의 방법으로 선택적 억제제를 HLM에 처리하여 독성평가를 수행하였다.

[0067] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 CPA의 대사 활성화는 CYP2B6 및 CYP3A4에 의해 나타나고, 레프루노마이드의 독성 약화는 CYP3A4가 주로 영향을 주는 것으로 확인되었다(도 7).

[0068] <실험예 2> 열처리한 HLM(heat-inactivated HLM)을 이용한 대사활성화 시스템에서 독성 약화 기전 확인

[0069] HLM을 이용한 바쿠치올 및 네파조돈의 독성 약화의 기전을 확인하기 위하여 열처리한 HLM(45°C, 30분 반응)을 이용하거나, 상기 열처리한 HLM의 농도에 따른 독성평가를 수행하였다. 실험은 상기 <실시예 1>의 방법으로 수행되었다.

[0070] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 열처리한 HLM을 사용한 독성평가에서 바쿠치올 및 네파조돈의 독성이 약화되고(도 8), 이는 열처리한 HLM의 농도의존적임을 확인함으로써(도 9), 이는 HLM 단백질에 대한 비특이적 결합에 의한 것임을 확인하였다.

[0071] <실험예 3> CPA 독성 대사체의 분석

[0072] HLM을 이용한 CPA 독성 대사체를 분석을 위해 LC-MS/MS를 수행하였다.

[0073] 구체적으로, HepG2 세포를 96웰 플레이트의 각 웰에 1.5×10^4 개를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 배양배지를 제거하고 CPA 500 및 5000 μ M을 녹인 DMEM 배지로 교환하였으며, 바로 NADPH-생성 시스템이 포함된 HLM을 처리하였다. 상기 HLM을 처리하고 6 또는 12시간 반응 후, 배지를 채취하고 동량의 차가운 아세토니트릴-메탄올(acetonitrile-methanol)을 1:1로 처리하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 얻어진 상등액을 LC-MS/MS를 이용하여 CPA의 대사체 분석에 사용하였다.

[0074] 그 결과, 표 1 및 표 2에서 나타난 바와 같이 HepG2 세포와 HLM과 함께 처리된 HepG2 세포에서 CPA의 대사체 분석에서 모든 대사체가 NADPH-생성 시스템이 존재하는 조건에서만 관찰되었다(표 1 및 표 2).

표 1

[0075] CPA 대사체의 크로마토그래피 및 질량분석 데이터

대사체	머무른 시간	[M+H] ⁺	MS2의 특성 이온(m/z)
디클로로에틸시클로포스파마이드	4.05	199	171*, 120, 78
이미노시클로포스파마이드	4.30	259	152, 140*, 138, 120, 110
포스파마이드 머스타드	4.05	221	185, 163*, 135, 106
4-히드록시시클로포스파마이드 (알도포스파마이드)	4.21	277	221*, 161, 142

표 2

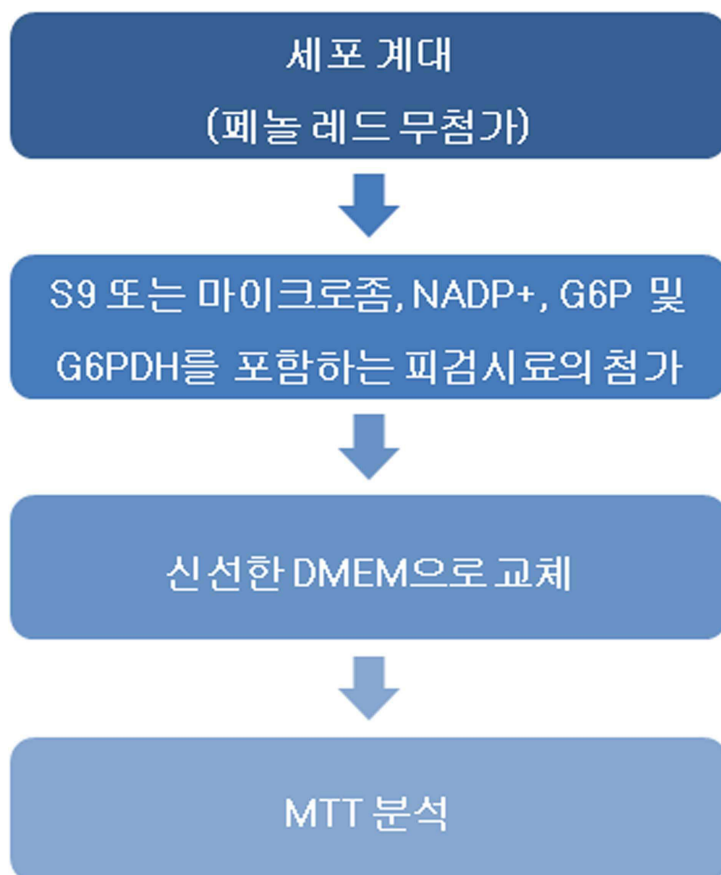
[0076] LC-MS/MS를 이용한 CPA 대사체의 동정

대사체	화학식	MRM	RT (분)	CPA	피크지역			
					+HLM		-HLM	
					6시간	12시간	6시간	12시간
디클로로에틸시클로포스파마이드	C ₅ H ₁₂ ClN ₂ O ₂ P	199>171	4.05	500	121500 ±4041	130000 ±2944*	ND	ND
				5000	1190000 ±40825	1240000 ±77028	ND	ND

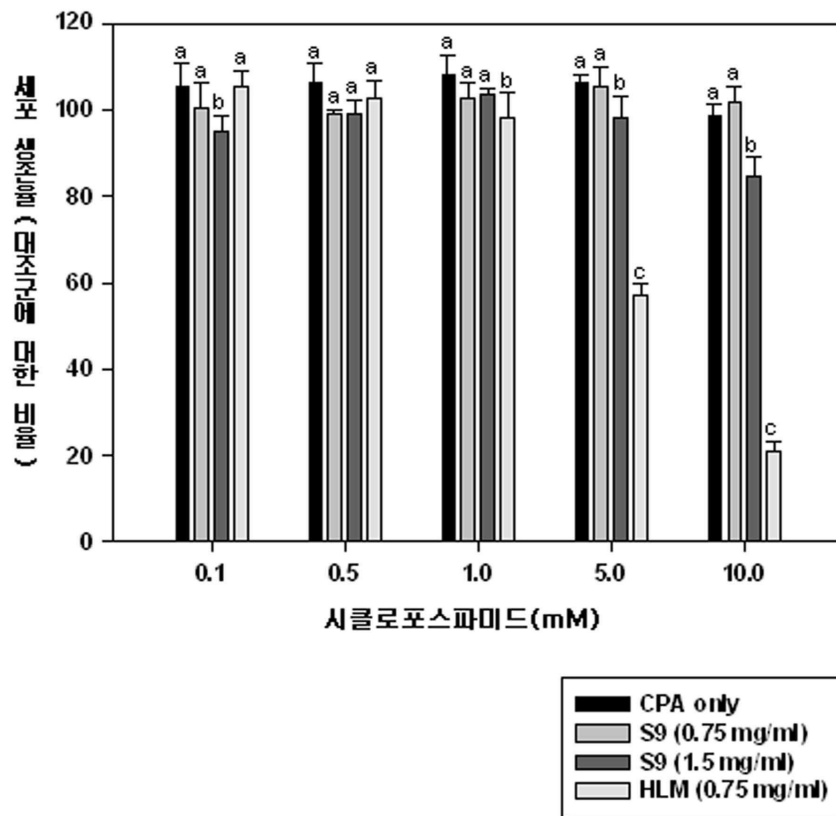
이미노시클로포스파마이드	$C_7H_{13}Cl_2N_2O_2P$	259>140	4.30	500	69400 ± 1858	58475 $\pm 1658^{***}$	ND	ND
				5000	149750 ± 2630	133500 $\pm 3109^{***}$	ND	ND
포스파마이드 머스타드	$C_4H_{11}Cl_2N_2O_2P$	221>163	4.05	500	44825 ± 2060	48400 ± 2267	ND	ND
				5000	233000 ± 9626	236000 ± 10863	ND	ND
4-히드록시시클로포스파마이드 (알도포스파마이드)	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_3P$	277>224	4.20	500	18350 ± 656	5953 $\pm 328^{***}$	ND	ND
				5000	96200 ± 5644	24700 $\pm 1431^{***}$	ND	ND

도면

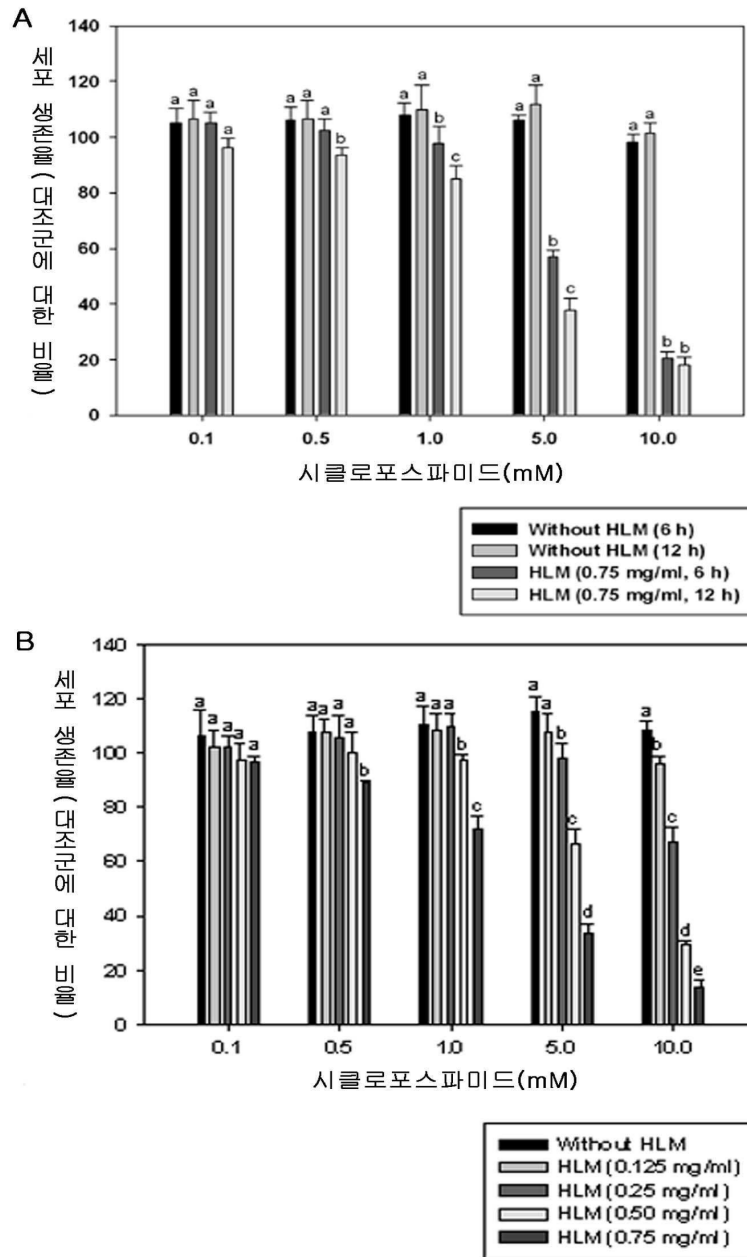
도면1



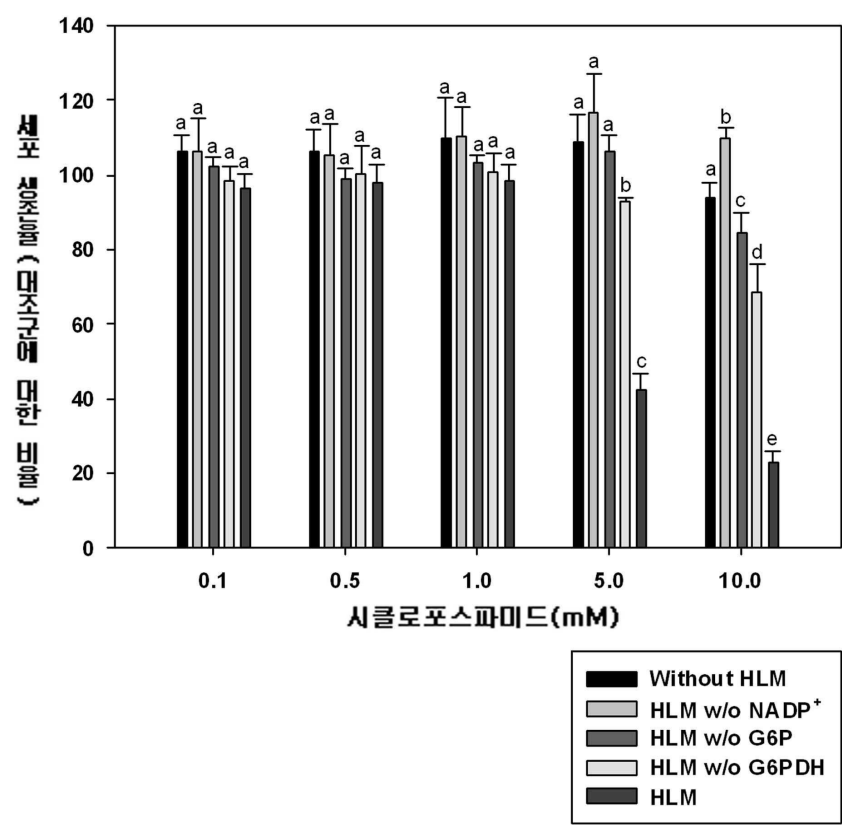
도면2



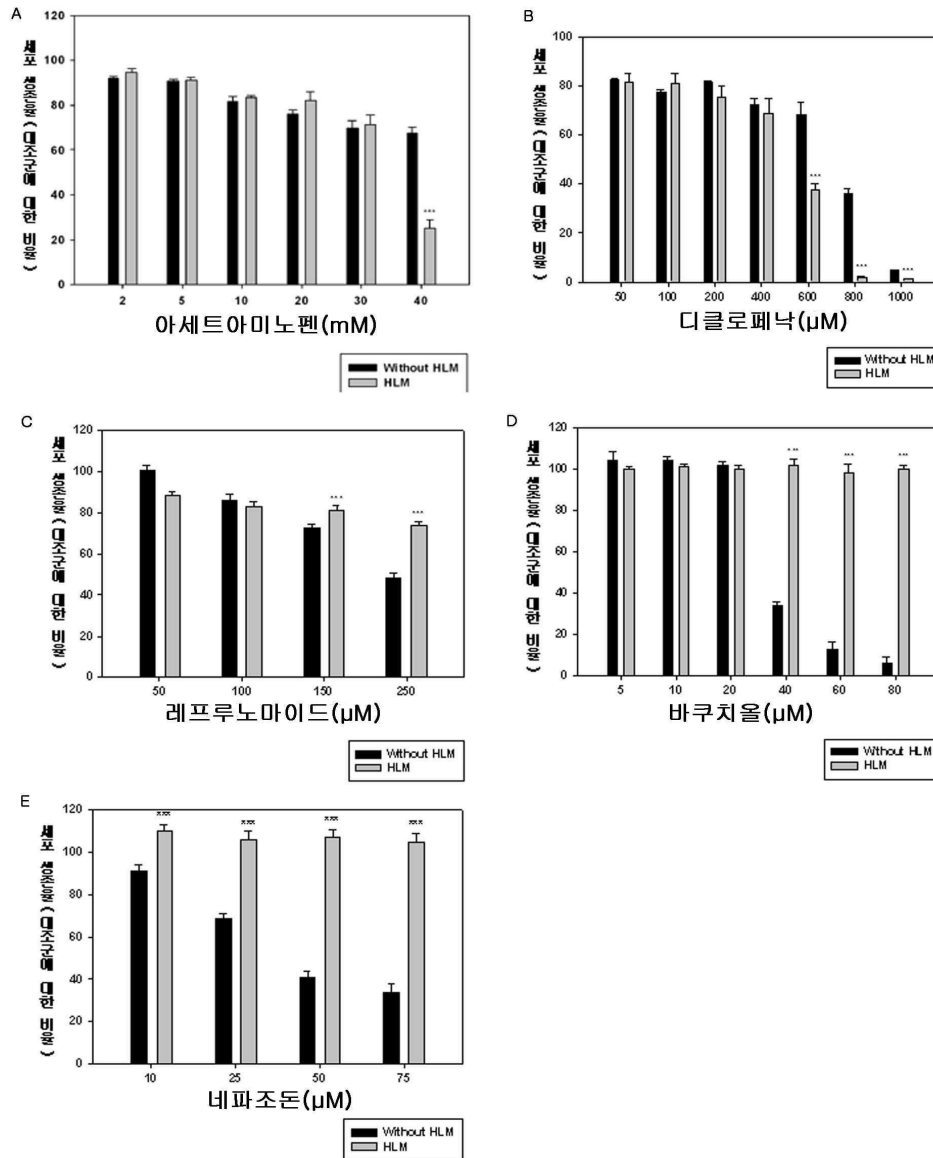
도면3



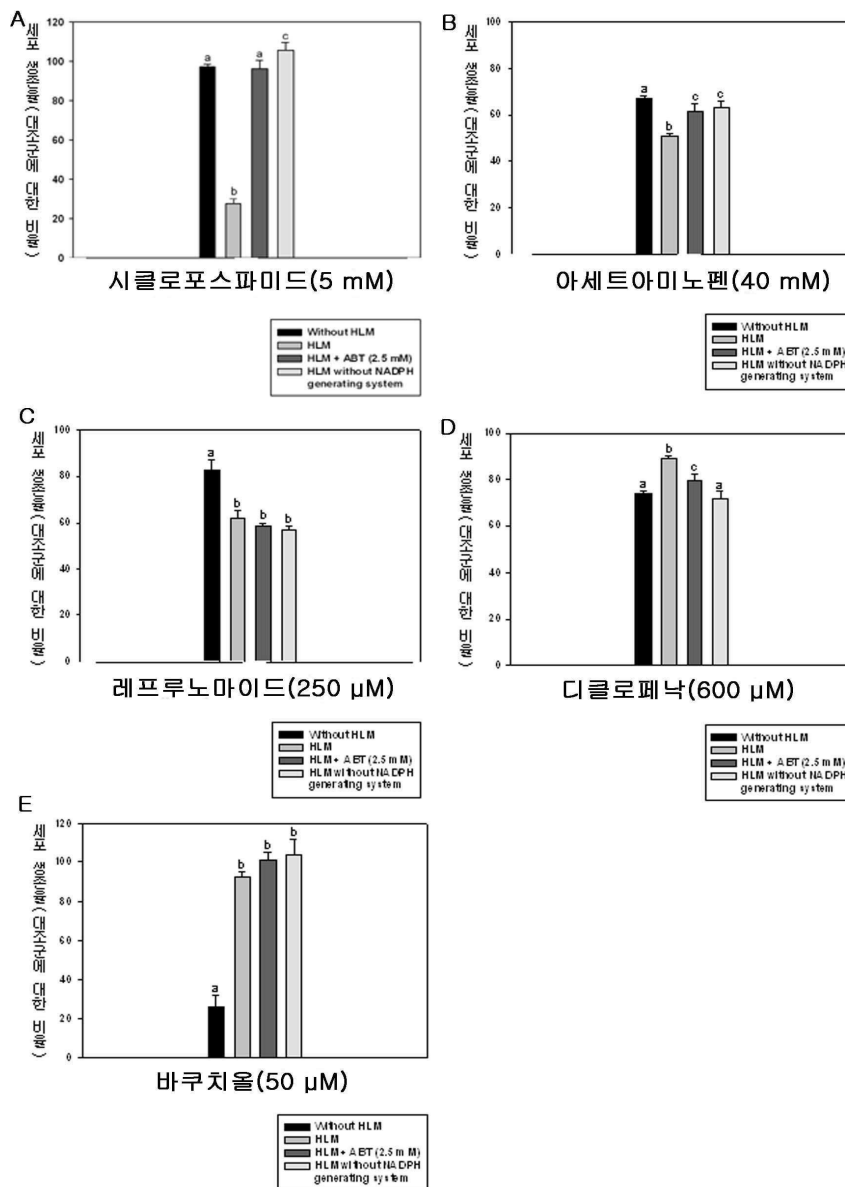
도면4



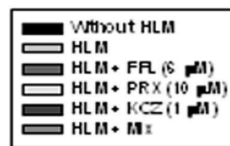
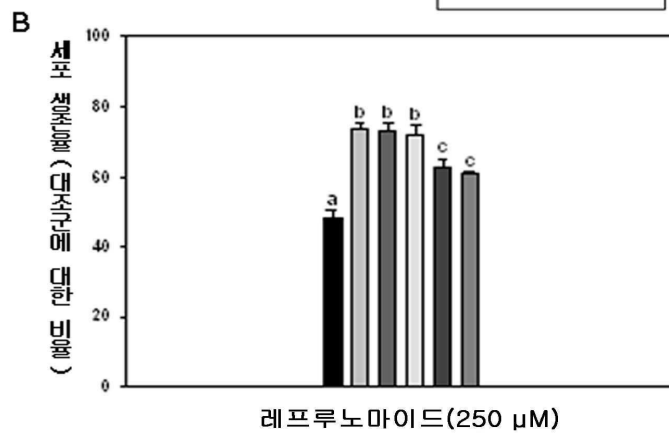
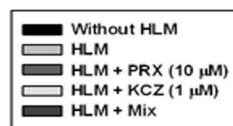
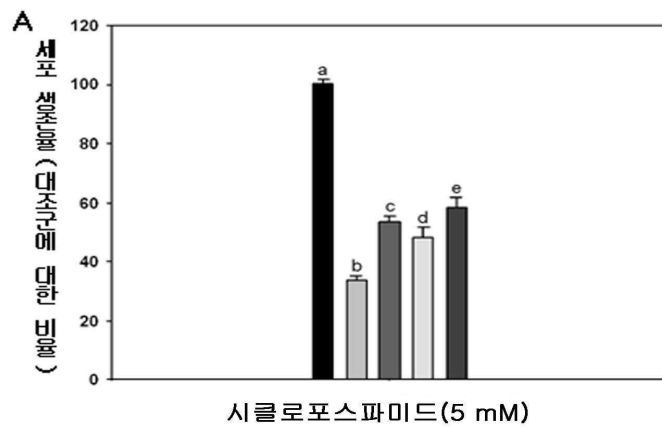
도면5



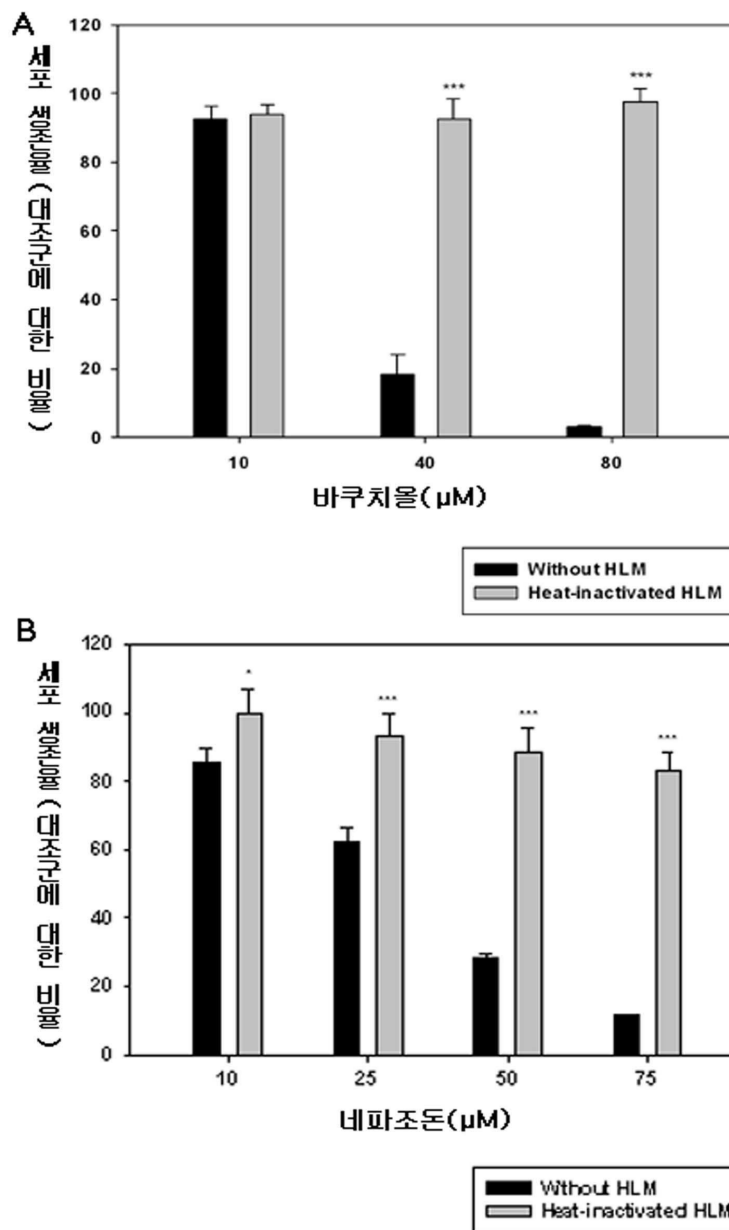
도면6



도면7



도면8



도면9

